

DOI: 10.11766/trxb201605130144

土壤悬液培养法研究长期施肥下花生根际解磷菌溶磷特性*

孙婷婷^{1, 2} 陈 晏^{1, 3†} 樊剑波^{1, 3} 何园球^{1, 3} 孙 波^{1, 3}

(1 中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008)

(2 中国科学院大学, 北京 100049)

(3 中国科学院红壤生态实验站, 江西鹰潭 335211)

摘 要 基于长期野外定位试验和室内土壤悬液培养, 研究长期不同有机与无机肥料配施 (纯化肥 (NPK)、化肥与厩肥配施 (NPKM) 和化肥与稻草秸秆配施 (NPKS)) 下, 花生根际土壤解磷菌对 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Ca-P)、 FePO_4 (Fe-P) 和 AlPO_4 (Al-P) 的溶解特性。结果表明: 有机无机肥配施促进了解磷菌的繁殖, 在 Ca-P 和 Fe-P 固体 NBRIP (国际植物研究所磷酸盐生长培养基) 培养基中, NPKM 处理可培养解磷菌密度分别为 6.15 和 5.80 $\log(\text{cfu g}^{-1} \text{dry soil})$, 高于其他处理。在分别以 Ca-P、Fe-P 和 Al-P 为唯一磷源的 NBRIP 液体培养基中添加土壤悬液培养 9 d 发现, NPKM 处理对 Fe-P 和 Al-P 的最高溶磷量分别为 221.8 mg kg^{-1} 和 205.5 mg kg^{-1} ; NPKS 处理对 Ca-P 的溶解有明显的优势。相比于单一菌株, 解磷菌溶磷能力无绝对优势, 但更能反映田间复杂条件下实际溶磷效果。通过土壤悬液培养法, 从微生物群体角度发现: 长期无机肥和厩肥配施更能促进花生根际解磷菌的繁殖以及对无机磷的溶解, 从而改善土壤缺磷状况, 提高花生生物量和产量。

关键词 有机肥与无机肥配施; 土壤悬液培养法; 解磷微生物; 有效磷; pH

中图分类号 S154.39 **文献标识码** A

磷是植物生长必不可少的一种大量元素。土壤中磷主要分为有机态和无机态, 其中无机态磷是农业土壤的主体, 一般占土壤磷库的 60%~80%^[1]。中国红壤主要分布在热带和亚热带地区, 占全国耕地总面积 28%^[2], 尽管红壤总磷含量较高, 但因其多与金属离子结合固定, 主要为 AlPO_4 (Al-P) 和 FePO_4 (Fe-P), 其中占到 80% 以上^[3], 有效磷含量普遍偏低^[4-5]。

土壤中磷的有效性不仅与土壤理化性质有关, 土壤功能微生物在磷的转化和循环过程中也起到了重要作用^[6]。崔邢等^[7] 研究解磷菌剂对不同类型

土壤有效磷的影响, 发现添加解磷菌剂能显著提高森林土壤有效磷含量; 且解磷菌剂的施加可减少磷肥 50% 的投入, 而作物产量无明显降低^[8-9]。微生物对无机磷的溶解主要通过代谢产生多种有机酸, 如甲酸、乙酸、柠檬酸和丁二酸等^[10]。伴随着 pH 的降低, 有机酸通过螯合作用, 置换释放出活性磷^[11-13]。解磷微生物的代谢活动主要集中在根际, 根际是土壤的热区, 为生物的生长繁殖创造了良好的条件^[14]。解磷微生物的代谢活性受多种环境因子的制约。研究表明温度^[15] 和含水量^[16] 等非生物因子能够改变解磷菌活性; 长期不同施肥对

* 中国科学院战略先导专项 (XDB15030200)、江苏省自然科学基金项目 (BK20141048) 和国家自然科学基金项目 (41471237) 资助 Supported by Strategic Priority Research Program (B) of the Chinese Academy of Sciences (No. XDB15030200), the Natural Science Foundation for Youths of Jiangsu Province of China (No. BK20141048) and the National Natural Science Foundation of China (No. 41471237)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: chenyan@issas.ac.cn

作者简介: 孙婷婷 (1990—), 女, 安徽安庆人, 硕士研究生, 主要从事土壤微生物生态学研究。E-mail: ttsun@issas.ac.cn

收稿日期: 2016-05-13; 收到修改稿日期: 2016-09-22; 优先数字出版日期 (www.cnki.net): 2016-10-12

土壤pH和土壤养分影响尤为突出,从而改变微生物的活性和功能^[17]。Fraser等^[18]研究发现加拿大北部草原长期不同施肥制度下解磷细菌丰度和多样性有明显差异。

目前,针对长期施肥对土壤生物功能优化研究主要集中于土壤碳、氮转化相关微生物^[19-20],关于磷素活化方面则主要通过纯培养筛选出可培养解磷菌,研究单一解磷菌株对无机磷的溶解效果^[6, 21]。单一菌株运用到田间试验时,由于其在整个土壤微生物群落中生态位小,会受到本土微生物群体的影响,难以发挥自身作用。根际磷的活化往往是解磷微生物群综合作用的结果,但长期不同施肥制度下,土壤解磷菌对不同无机磷的溶磷效果如何,不同施肥处理之间有何区别,与单一菌株有何差异,这些均尚未可知。此外,虽然纯培养技术运用比较广泛,但是,由于其只能筛选到很少一部分目的微生物,对于环境中整体微生物的研究仍然有所欠缺。本文选取了土壤悬液与培养液共培养技术,研究不同环境中原土解磷微生物群体对无机磷源的溶解特性。

花生是南方地区重要经济作物,其中江西省年种植面积平均为 $1.3 \times 10^6 \text{ hm}^2$ ^[4]。本文选取花生为研究对象,通过田间和室内微生物培养试验,研究28年长期试验地氮磷钾、氮磷钾-厩肥和氮磷钾-稻草秸秆配施下,花生根际解磷菌体对难溶性无机磷的综合溶磷特点,从而客观阐述长期施肥下根际优势解磷菌结构和丰度的演替对根际土壤活性磷的影响。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

中国科学院红壤生态实验站位于江西省鹰潭市余江县刘家站(28°12'N, 116°55'E)。该地属于中亚热带地区,气候温热多雨,年平均温度17.6℃,≥10℃积温5 528℃,年降水量1 795 mm,年蒸发量1 318 mm。供试土壤为第四纪红色黏土发育的旱地红壤。该长期定位试验自1988年开始实施,土壤初始基本理化性质:有机质13.76 g kg⁻¹,全氮0.87 g kg⁻¹,铵态氮4.87 mg kg⁻¹,有效磷30.45 mg kg⁻¹,速效钾167.3 mg kg⁻¹,pH 3.95。

1.2 田间试验设计

本研究选取长期试验地的3个处理,分别为:

NPK(纯化肥):尿素240 kg hm⁻²,钙镁磷肥570 kg hm⁻²,氯化钾285 kg hm⁻²;NPKM(70%的化肥+30%的厩肥):尿素168 kg hm⁻²,钙镁磷肥313 kg hm⁻²,氯化钾258 kg hm⁻²,厩肥5 379 kg hm⁻²(N:6.16 g kg⁻¹;P₂O₅:5.73 g kg⁻¹;K₂O:3.01 g kg⁻¹);NPKS(70%化肥+30%稻草秸秆):尿素168 kg hm⁻²,钙镁磷肥431 kg hm⁻²,氯化钾152 kg hm⁻²,稻草秸秆4 324 kg hm⁻²(N:7.66 g kg⁻¹;P₂O₅:3.85 g kg⁻¹;K₂O:18.41 g kg⁻¹),每处理三个重复。有机肥均腐熟后施用。小区布置采用随机分布,面积为34.6 m²,每个小区均用水泥板隔开(水泥板地上部分20 cm,地下部分30 cm)。养分含量计算以相同含氮量为标准,保证每个处理N、P、K总量一致。

本试验所用花生品种为赣花5号。花生于2015年4月上旬播种。

1.3 土壤样品采集与分析

在花生花针期通过抖土法采集花生根际土(根系周围1 cm土壤)^[22],分成两份,一份4℃保存,用于土壤基本理化性质的测定;一份-20℃保存,用于土壤微生物实验。

土壤基本理化性质测定参考鲁如坤^[23]的方法:pH采用pH计测定(水土比为2.5:1);土壤有机质采用重铬酸钾外加热法测定;土壤全氮采用凯氏法测定;土壤全磷采用HClO₄-H₂SO₄浸提-钼蓝比色法测定;有效磷采用0.03 mol L⁻¹NH₄F-0.25 mol L⁻¹HCl浸提-钼蓝比色法测定;土壤速效钾采用NH₄OAc浸提-火焰光度法测定。

1.4 可培养解磷菌密度的测定

NBRIP(国际植物研究所磷酸盐生长培养基,National Botanical Research Institute Phosphate growth medium)液体培养基的配制:葡萄糖10 g,氯化镁5 g,硫酸铵1 g,七水硫酸镁0.25 g,氯化钾0.2 g和难溶性磷酸盐(磷酸三钙5 g、磷酸铁4.86 g和磷酸铝3.93 g,分别以Ca-P、Fe-P和Al-P表示),调节pH至7.0,蒸馏水定容至1 000 ml。固体培养基即在上述对应液体培养基中添加20 g L⁻¹琼脂。

所用土样为花生花针期根际土,采用稀释涂布平板法测定土壤悬液可培养解磷微生物密度,具体方法为:取1 g土加入9 ml无菌水中,涡旋混匀,用10倍稀释法将土壤悬液依次稀释至10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ g ml⁻¹,分别取100 μl涂布至Ca-P、Fe-P和

Al-P固体培养基上^[21]，每处理三个重复，30℃培养2 d，观察出现的溶磷微生物菌落数量以及溶磷圈直径，研究不同施肥制度下花生根际可培养解磷微生物的密度和特性。

1.5 土壤悬液解磷微生物溶磷能力测定

解磷微生物溶磷能力测定是在Chen等^[21]的研究方法基础上加以改进：取1g土（保存在-20℃的根际土）加入9 ml 无菌水中，涡旋混匀，分别取200 μl土壤悬液加入装有50 ml已灭菌的培养基（Ca-P、Fe-P和Al-P液体培养基）中，30℃下160 r min⁻¹摇床培养9 d，每隔1 d取土壤悬液5 ml于4000 r min⁻¹、4℃离心10 min，取上清液测定有效磷含量和pH^[23]。设不接菌为对照，每处理重复3次。

1.6 数据处理

采用Microsoft Excel 2007进行数据整理，SPSS 17.0单因素方差分析（one-way ANOVA）和最小显著差异法（LSD）比较不同处理数据间的差异。采用SigmaPlot 12.5进行绘图；采用CONOCO 4.5 for windows分析不同处理的相对影响。

2 结 果

2.1 不同施肥处理花生根际土壤性质及花生生长特性

长期不同施肥制度对土壤基本性质影响如表1：相对于纯化肥处理，有机无机肥配施提高了土壤养分，有机质和全氮的提高幅度分别为14.30%~20.58%和21.65%~27.84%。同时，NPKS处理对速效钾的增幅高于NPKM，速效钾含量较NPK高48.40%；NPKM处理对土壤全磷和有效磷的贡献明显，全磷和有效磷含量分别高出NPK处理125.4%和89.40%，而NPKS与NPK处理持平。pH是土壤性质的重要指标，不仅能影响养分形态也能改变微生物群落结构。由表1可知，有机无机肥配施均不同程度提高了土壤pH，NPKM处理的作用更为显著，pH较NPK处理高0.18个单位。

长期有机肥和无机肥配施提高作物产量和秸秆量（稻草秸秆处理不明显），但是对株高和根长无显著影响（表2）。

典型对应分析（CCA）结合多元回归分析，主

表1 不同处理下土壤基本性质

Table 1 Soil basic properties relative to treatment

处理 Treatment	pH	有机质 Organic matter (g kg ⁻¹)	全氮 Total N (mg kg ⁻¹)	全磷 Total P (mg kg ⁻¹)	有效磷 Available P (mg kg ⁻¹)	速效钾 Available K (mg kg ⁻¹)
NPK	3.96 ± 0.06a	13.85 ± 0.46a	0.97 ± 0.09a	0.63 ± 0.04a	48.63 ± 16.73a	195.8 ± 0.74a
NPKM	4.14 ± 0.05b	16.70 ± 0.60b	1.24 ± 0.04b	1.42 ± 0.07b	483.4 ± 54.37b	210.4 ± 0.86b
NPKS	3.99 ± 0.04a	15.83 ± 0.14b	1.18 ± 0.08b	0.57 ± 0.04a	39.06 ± 6.52a	290.5 ± 4.55c

注：NPK：纯化肥处理，NPKM：化肥和厩肥配施，NPKS：化肥和稻草秸秆配施。表中数值为平均值 ± 标准差；同一列不同字母表示在5%水平上差异显著，即 $p < 0.05$ 。下同 Note: NPK: pure chemical fertilizer, NPKM: combination of chemical fertilizer and pig manure, NPKS: combination of chemical fertilizer and rice straw. Values in table as mean ± standard deviation; different letters mean significant difference at $p < 0.05$. The same below

表2 不同处理下花生生长特性

Table 2 Peanut growth characteristics relative to treatment

处理 Treatment	株高 Plant height (cm)	产量 Yield (kg hm ⁻²)	秸秆生物量 Straw biomass (g plant ⁻¹)	根长 Root length (cm)
NPK	39.67 ± 5.86a	958.1 ± 30.73a	5.30 ± 1.18ab	13.67 ± 1.53a
NPKM	40.67 ± 2.08a	1062 ± 33.37b	7.42 ± 0.67b	14.67 ± 1.15a
NPKS	39.00 ± 4.00a	1023 ± 26.28ab	3.90 ± 0.93a	14.33 ± 0.58a

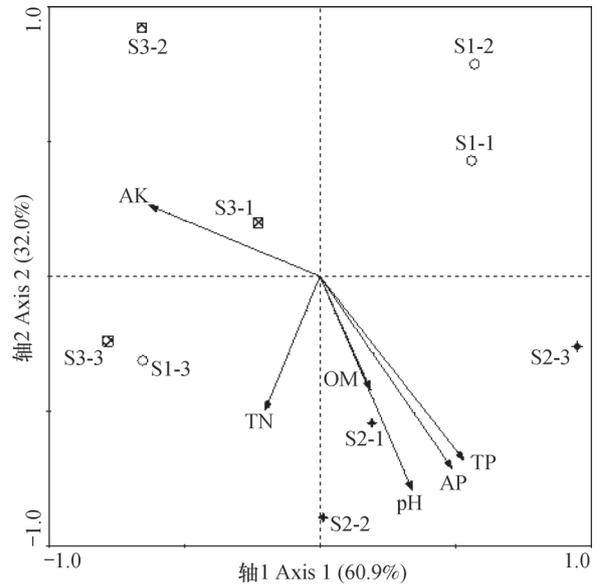
要用于研究环境因子对生物群落结构的影响^[24]。本文通过CCA表征不同施肥处理下土壤理化性质对花生生长的影响(图1),坐标轴共解释了92.9%的变异,表明土壤有机质、pH以及磷(全磷和有效磷)与NPKM处理花生生长呈正相关,其中土壤磷对花生的影响突出,说明花生产量和生物量对磷更为敏感。

2.2 不同施肥处理下可培养解磷微生物的变化

研究三种施肥处理下花生根际土壤在Ca-P、Fe-P和Al-P培养基中形成的溶磷圈数量以及溶磷圈直径,涂布计数结果(表3)表明,三种处理在不同磷源培养基中产生的解磷微生物密度各异,在Ca-P和Al-P固体培养基中形成的解磷微生物密度均大于6 log (cfu g⁻¹ dry soil)(除了NPKS在Ca-P解磷微生物密度为5.72 log (cfu g⁻¹ dry soil));而在Fe-P固体培养基,解磷微生物密度为5.42~5.80 log (cfu g⁻¹ dry soil)。同时,在Ca-P固体培养基中,溶磷圈直径要明显大于Fe-P和Al-P,说明解磷微生物在Ca-P培养基中的适应能力更强。此外,在Fe-P和Ca-P固体培养基中,不同处理下可培养解磷微生物密度彼此差异显著(p<0.05),且NPKM处理占据优势;而在Al-P培养基中基本持平。可见解磷微生物对磷源的利用具有选择性。

2.3 不同施肥处理下土壤悬液有效磷变化

根据图2结果发现:不同施肥处理下,解磷



注:图中S1-1, S1-2, S1-3表示NPK处理的三个不同取样点;S2-1, S2-2, S2-3表示NPKM处理的三个不同取样点;S3-1, S3-2, S3-3分别表示NPKS处理的三个不同取样点, AK、TP和OM分别表示速效钾、全磷和有机质。Note: S1-1, S1-2 and S1-3 stand for three different sampling sites in TreatmentNPK; S2-1, S2-2 and S2-3 for three different sampling sites in TreatmentNPKM; S3-1, S3-2 and S3-3 for three different sampling sites TreatmentNPK; AK, TP and OM for available potassium, total phosphorus, and organic matter, respectively

图1 不同施肥处理下土壤性质对花生生长的典型对应分析

Fig. 1 Canonical correspondence analysis of soil properties and growth of peanut relative totreatment

表3 不同处理下可培养解磷微生物

Table 3 Cultivable phosphate-solubilizing microorganisms in the soil relative to treatment

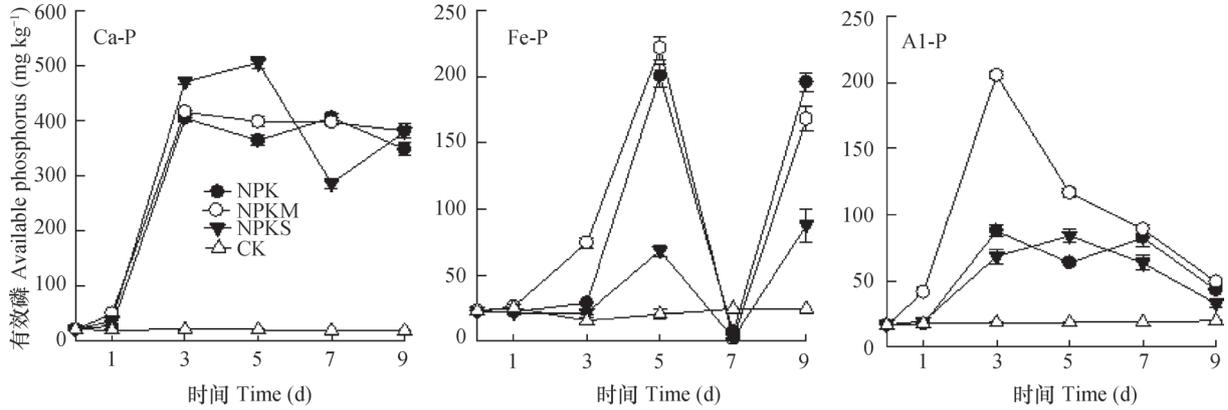
处理 Treatment	密度 Density (log (cfu g ⁻¹ dry soil))			菌落直径 Colony diameter (mm)		
	Ca-P	Fe-P	Al-P	Ca-P	Fe-P	Al-P
NPK	6.11 ± 0.02b	5.57 ± 0.05b	6.07 ± 0.03a	2.4 ± 0.1a	1.2 ± 0.1a	1.4 ± 0.1a
NPKM	6.15 ± 0.01b	5.80 ± 0.03c	6.02 ± 0.02a	2.4 ± 0.1a	1.4 ± 0.1ab	1.7 ± 0.1b
NPKS	5.72 ± 0.03a	5.42 ± 0.06a	6.06 ± 0.02a	2.7 ± 0.1b	1.6 ± 0.1b	1.5 ± 0.1a

注: Ca-P、Fe-P、Al-P分别表示以Ca₃(PO₄)₂、FePO₄和AlPO₄为唯一磷源的培养基。下同 Note: Ca-P、Fe-P and Al-P stands for medium based on Ca₃(PO₄)₂、FePO₄ and AlPO₄, respectively, as the sole phosphorus source. The same below

微生物对三种难溶性无机磷的溶解能力表现出一致性,溶解顺序为Ca-P>Fe-P>Al-P。其中,在Al-P和Fe-P中NPKM处理的溶解能力最高,Al-P土壤悬液培养3 d,有效磷达到205.5 mg kg⁻¹,Fe-P土壤悬液培养5 d有效磷达221.8 mg kg⁻¹;其中在Al-P中,NPKM较NPK和NPKS高

134.6%~144.6%,在Fe-P中较NPK和NPKS高10.48%~153.2%,差异显著(p<0.001)。在Ca-P土壤悬液中,NPKS处理的溶磷能力优于其他处理,其溶磷量分别较NPKM和NPK处理高21.33%和24.57%。

不同施肥处理在同一磷源条件下溶磷曲线表



注：CK表示不加土壤悬液的处理，其他培养条件一致。下同 Note: CK stands for control treatment in the same culture condition, but with no soil suspension added. The same below

图2 不同处理对三种土壤悬液中有效磷含量影响

Fig. 2 Content of AP in the soil solution relative to treatment

现出一致性，但在不同磷源中，却有明显差异。在Ca-P和Al-P土壤悬液中，三种处理在土壤悬浮液中有有效磷含量均呈现先上升后下降趋势，而在Fe-P土壤悬液中，表现出截然不同的溶磷曲线：整个培养周期内，土壤悬液中有有效磷含量一直处于上下波动状态，NPK、NPKM和NPKS分别在培养5 d、5 d和9 d后有效磷含量达到最高，分别为200.8、221.8和87.62 mg kg⁻¹，而在培养7 d时土壤悬液中有有效磷均低于对照。为了解释这一现象，同时分析了在Fe-P土壤悬液中解磷微生物的生长趋势（图3），结果显示，随着培养时间的延长，解磷微生物数量呈现先上升后下降趋势，特别是在培养5 d之后，解磷微生物数量急速下降，随后仍然保持下降趋势，但下降幅度有所缓和。解磷微生物

数量的骤减可能是Fe-P溶磷曲线出现差异的重要原因。

2.4 不同施肥处理下土壤悬液pH变化

三种施肥处理下花生根际土壤悬液在不同无机磷源中培养9 d，每隔1 d测定土壤悬液pH，结果如图4。三种处理在不同土壤悬液中pH变化趋势一致，均是先急剧下降后趋于稳定，且在第3天达到最低（NPK和NPKM在Ca-P土壤悬液中培养9 d和7 d时pH降至最低，分别为5.10和5.26），且与有效磷含量呈负相关。NPK、NPKM和NPKS处理在Ca-P土壤悬液中pH与有效磷含量相关系数分别为-0.964 ($p < 0.01$)、-0.841 ($p < 0.05$)和-0.942 ($p < 0.01$)。不同无机磷源土壤悬液中pH的下降幅度有所区别，在Fe-P土壤悬液中，pH下降幅度为4.75 ~ 4.87；Ca-P土壤悬液pH下降幅度为1.79 ~ 2.32，差异明显 ($p < 0.001$)。

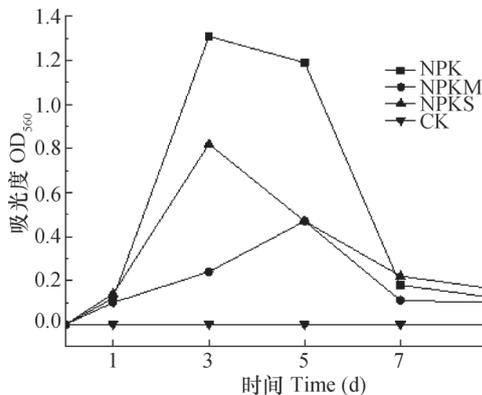


图3 不同处理解磷微生物在Fe-P土壤悬液中的吸光度变化曲线

Fig. 3 Turbidity variation curve of Fe-P soil suspension with phosphorus-dissolving microorganism relative to treatment

3 讨论

3.1 长期不同施肥制度对花生生产量影响

有机无机肥配施花生生产量以及生物量均显著高于单施化肥处理，且无机肥与厩肥配施效果最佳。许小伟等^[25]研究也发现，有机无机肥配施处理较单施化肥处理更能提高花生生产量。有机无机肥配施明显提高了根际土壤养分含量，李晨华等^[26]也提出厩肥与化肥配施能够提高土壤各养分含量，表明长期添加有机肥影响了土壤养分的积累。而不同有机肥类型对其程度有所区别^[14]。

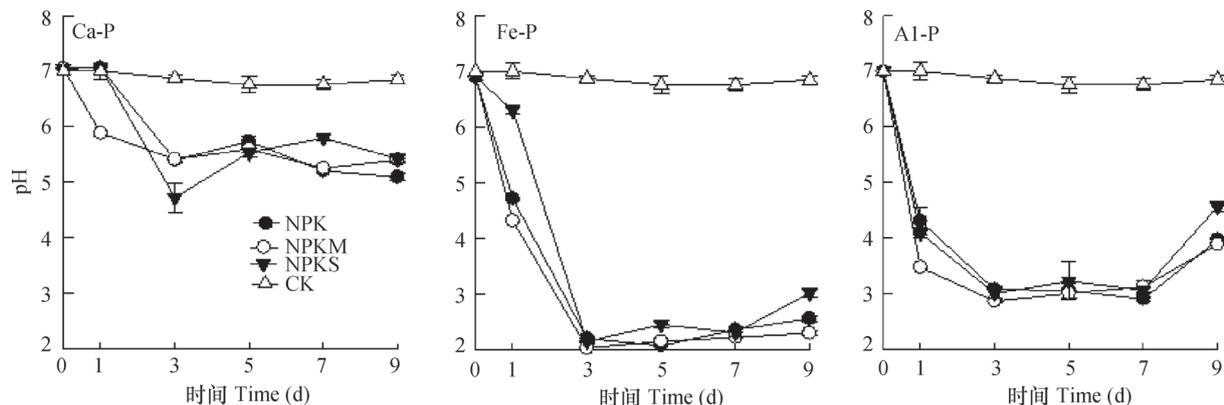


图4 不同施肥处理土壤悬液pH随时间变化

Fig. 4 Temporal variation of pH in soil suspension relative to treatment

杨芳等^[5]研究表明, 化肥与厩肥配施较其他有机无机肥配施更能提高全磷和有效磷含量。在本研究中, 也得出相似的结论: 长期无机肥与厩肥(NPKM)配施提高了土壤全磷和有效磷含量, 分别高出NPK处理125.4%和894.0%, 而无机肥与稻草秸秆配施(NPKS)和单施化肥(NPK)下土壤磷含量较低。各处理N、P、K投入量相等, 但是随着时间的推移, 养分在土壤中的总累积量以及有效含量会有所不同, 化肥与厩肥配施下, 土壤磷的保持效果更好, 磷的有效性更高, 这可能是化肥与厩肥配施下花生产量和生物量高于其他处理的主要原因。由于长期花生连作, 可能会产生连作障碍, 从而影响土壤养分和产量^[27-28]。在本试验中, 花生产量和秸秆生物量普遍偏低(NPKS处理秸秆3.90 g 株⁻¹), 其中产量不足红壤区非长期连作土壤的50%^[25]。不同有机无机肥作用下, 连作障碍程度以及障碍因子在今后的研究中需要进一步探索。

3.2 长期不同施肥制度对花生根际解磷菌影响

NPKM处理的溶磷能力高于NPK和NPKS, 在Al-P和Fe-P土壤悬浮液中尤为突出。这也解释了NPKM处理下土壤有效磷显著高于其他处理的原因。微生物的繁殖需要从周围环境吸取养分, 有机肥本身含有一些微生物以及大量碳水化合物, 有助于微生物的繁殖^[29]。杨艳菊等^[30]表示施加有机肥能够明显提高土壤解磷细菌的数量; 李晨华等^[26]和夏昕等^[31]研究也表明施加有机肥处理细菌和真菌数量显著高于纯化肥处理。在本试验中, NPKS和NPK处理土壤pH显著低于NPKM处理, 土壤微生物对环境变化十分敏感, 研究^[32-33]发现长期施用化肥土壤pH下降, 从而降低了土壤

微生物多样性。长期不同施肥处理下, 土壤微生物会根据环境变化, 优胜劣汰形成特有的微生物圈^[34], 解磷微生物菌在丰度、结构以及生物功能上自然也会不同。本研究中, NPKM处理可培养解磷菌密度明显高于其他处理, NPKM处理能够提供较为充足和平衡的养分以及适宜的生存环境, 促进解磷菌的繁殖, 这些可能导致NPKS和NPK处理溶磷能力低于NPKM处理。在培养过程中, 又会根据对磷源的亲和能力高低, 形成相应的针对不同磷源的优势解磷菌, 从而对不同无机磷表现出溶解差异。NPKM处理对Al-P和Fe-P的溶解量分别为205.5 mg kg⁻¹和221.8 mg kg⁻¹。相较于单一菌体, 分散泛菌^[21]对Al-P和Fe-P的溶磷量均不超过50 mg kg⁻¹, 洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderiacepacia*)^[35]对Fe-P的溶磷量227 mg kg⁻¹, 解磷菌在溶磷能力上并无绝对优势, 而梅新兰等^[36]表示复合菌群的溶磷效果高于单一菌株解磷微生物。本文采用土壤悬液培养法, 针对土壤解磷微生物群体溶磷特点研究, 在一定程度上是纯培养方法的补充, 也是微生物研究的一项探索。相对于单一菌株的纯培养, 土壤悬液微生物菌群的培养环境更加复杂, 因此, 关于解磷菌的溶磷原理仍需进一步研究。

4 结论

通过土壤悬液共培养法研究发现: 氮磷钾—厩肥配施处理显著提高Ca-P和Fe-P相关可培养解磷菌密度; 氮磷钾—厩肥处理对无机磷的溶解优势明显, 尤其是对Fe-P和Al-P的溶解。长期氮磷钾—

厩肥配施为解磷菌的繁殖提供了更加丰富的养分环境, 从而更有利于其对根际土壤无机磷的活化。

参考文献

- [1] 王永壮, 陈欣, 史奕. 农田土壤中磷素有效性及影响因素. 应用生态学报, 2013, 24 (1) : 260—268
Wang Y Z, Chen X, Shi Y. Phosphorus availability in cropland soils of China and related affecting factors (In Chinese). Journal of Applied Ecology, 2013, 24 (1) : 260—268
- [2] 龙光强, 蒋瑞霖, 孙波. 长期施用猪粪对红壤酸度的改良效应. 土壤, 2012, 44 (5) : 727—734
Long G Q, Jiang Y J, Sun B. Effects of long-term application of pig manure on ameliorating acidity of red soil (In Chinese). Soils, 2012, 44 (5) : 727—734
- [3] 李杰, 石元亮, 陈智文. 我国南方红壤磷素研究概况. 土壤通报, 2011, 42 (3) : 763—768
Li J, Shi Y L, Chen Z W. Research on phosphorus in southern red soils of China (In Chinese). Chinese Journal of Soil Science, 2011, 42 (3) : 763—768
- [4] 许小伟, 樊剑波, 陈晏, 等. 不同有机无机肥配施比例对红壤旱地花生产量、土壤速效养分和生物学性质的影响. 生态学报, 2014, 34 (18) : 5182—5190
Xu X W, Fan J B, Chen Y, et al. Effects of combined application of organic and chemical fertilizers on the yield of peanut, soil available nutrient and biological properties in the upland red soil in subtropical China (In Chinese). Acta Ecologica Sinica, 2014, 34 (18) : 5182—5190
- [5] 杨芳, 何园球, 李成亮, 等. 不同施肥条件下旱地红壤磷素固定及影响因素的研究. 土壤学报, 2006, 43 (2) : 267—272
Yang F, He Y Q, Li C L, et al. Effect of fertilization on phosphorus fixation in upland red soil and its affecting factors (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2006, 43 (2) : 267—272
- [6] Salma T, Martin T, Paola M S, et al. Trapping of phosphate solubilizing bacteria on hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198. Soil Biology & Biochemistry, 2015, 90: 1—9
- [7] 崔邢, 张亮, 林勇明, 等. 不同土壤条件下解磷菌处理对巨尾桉土壤有效磷含量的影响. 应用与环境生物学报, 2015, 21 (4) : 740—746
Cui X, Zhang L, Lin Y M, et al. Effects of phosphate-solubilizing bacteria treatment under different soil conditions on *Eucalyptus grandis* x *E. Urophylla* soil available phosphorus content (In Chinese). Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2015, 21 (4) : 740—746
- [8] Jilani G, Akram A, Ali R M, et al. Enhancing crop growth, nutrients availability, economics and beneficial rhizosphere microflora through organic and biofertilizers. Annals Microbiology, 2007, 57 (2) : 177—184
- [9] Chen Y P, Rekha P D, Arun A B, et al. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Applied Soil Ecology, 2006, 34 (1) : 33—41
- [10] 张亮, 杨宇虹, 李倩, 等. 自生固氮菌活化土壤无机磷研究. 生态学报, 2013, 33 (7) : 2157—2164
Zhang L, Yang Y H, Li Q, et al. Mobilization of inorganic phosphorus from soils by five azotobacters (In Chinese). Acta Ecologica Sinica, 2013, 33 (7) : 2157—2164
- [11] Trivedi P, Sa T. *Pseudomonas corrugata* (NRRL B-30409) mutants increased phosphate solubilization, organic acid production, and plant growth at lower temperatures. Current Microbiology, 2008, 56 (2) : 140—144
- [12] Mullen M D. Phosphorus in soils: Biological interactions. Encyclopedia of Soils in the Environment, 2005 (2) : 210—215
- [13] 林启美, 赵小蓉, 孙炎鑫, 等. 四种不同生态系统的土壤解磷细菌数量及种群分布. 土壤与环境, 2000, 9 (1) : 34—37
Lin Q M, Zhao X R, Sun Y X, et al. Community characters of soil phosphor-bacteria in four ecosystems (In Chinese). Soil and Environment, 2000, 9 (1) : 34—37
- [14] 孙波, 廖红, 苏彦华, 等. 土壤-根系-微生物系统中影响氮磷利用的一些关键协同机制的研究进展. 土壤, 2015, 47 (2) : 210—219
Sun B, Liao H, Su Y H, et al. Advances in key coordinative mechanisms in soil-root-microbe systems to affect nitrogen and phosphorus utilization (In Chinese). Soils, 2015, 47 (2) : 210—219
- [15] Chang C H, Yang S S. Thermo-tolerant phosphate-solubilizing microbes for multi-functional biofertilizer preparation. Bioresource Technology, 2009, 100 (4) : 1648—1658
- [16] Hamel C, Hanson K, Selles F, et al. Seasonal and long-term resource-related variations in soil microbial communities in wheat-based rotations of the Canadian prairie. Soil Biology & Biochemistry, 2006, 38 (8) : 2104—2116
- [17] 刘晓利, 樊剑波, 蒋瑞霖. 不同施肥制度甘蔗地土壤养分对微生物群落结构的影响. 生态学报, 2014, 34

- (18): 5242—5248
Liu X L, Fan J B, Jiang Y J. The discussion of affecting factors on soil microbial community structure in a sugarcane land under different fertilization treatments (In Chinese). *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34 (18): 5242—5248
- [18] Fraser T, Lynch D H, Entz M H, et al. Linking alkaline phosphatase activity with bacterial *phoD* gene abundance in soil from a long-term management trial. *Geoderma*, 2015, 257/258: 115—122
- [19] Zachary B F, Karl J R, Rima A U, et al. Differential responses of total and active soil microbial communities to long-term experimental N deposition. *Soil Biology & Biochemistry*, 2015, 90: 275—282
- [20] Huang G, Cao Y F, Wang B, et al. Effects of nitrogen addition on soil microbes and their implications for soil C emission in the Gurbantunggut Desert, center of the Eurasian Continent. *Science of the Total Environment*, 2015, 515/516: 215—224
- [21] Chen Y, Fan J B, Du L, et al. The application of phosphate solubilizing endophyte *Pantoea dispersa* triggers the microbial community in red acidic soil. *Applied Soil Ecology*, 2014, 84: 235—244
- [22] 戴雅婷, 侯向阳, 闫志坚, 等. 库布齐沙地两种植被恢复类型根际土壤微生物和土壤化学性质比较研究. *生态学报*, 2016, 36 (20): 1—12
Dai Y T, Hou X Y, Yan Z J, et al. Soil microbes and the chemical properties of the rhizosphere and non-rhizosphere soil under two types of vegetation restoration in the hobq sandy land of Inner Mongolia, China (In Chinese). *Acta Ecologica Sinica*, 2016, 36 (20): 1—12
- [23] 鲁如坤. 土壤农业化学分析法. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2000
Lu R K. Analytical methods for soil and agro-chemistry (In Chinese). Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000
- [24] Hu R, Gu J G, Nie X, et al. A comparison of phytoplankton assemblages in three subtropical pumped storage reservoirs based on CCA analysis. *Ecological Science*, 2008, 27 (5): 315—319
- [25] 许小伟, 樊剑波, 陈晏, 等. 有机无机肥配施对红壤旱地花生生理特性、产量及品质的影响. *土壤学报*, 2015, 52 (1): 174—182
Xu X W, Fan J B, Chen Y, et al. Effect of manure combined with chemical fertilizer application on yield, kernel quality and physiological characteristics of peanut to red soil in subtropical China (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2015, 52 (1): 174—182
- [26] 李晨华, 贾仲君, 唐立松, 等. 不同施肥模式对绿洲农田土壤微生物群落丰度与酶活性的影响. *土壤学报*, 2012, 49 (3): 567—574
Li C H, Jia Z J, Tang L S, et al. Effect of model of fertilization on microbial abundance and enzyme activity in oasis farmland soil (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2012, 49 (3): 567—574
- [27] 郑亚萍, 王才斌, 黄顺之, 等. 花生连作障碍及其缓解措施研究进展. *中国油料作物学报*, 2008, 30 (3): 384—387
Zheng Y P, Wang C B, Huang S Z, et al. Obstacle and countermeasure of sustainable high yield for peanut in low-hilly red soil region (In Chinese). *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2008, 30 (3): 384—387
- [28] 王明伟, 刘雨迪, 陈小云, 等. 旱地红壤线虫群落对不同耕作年限的响应及指示意义. *土壤学报*, 2016, 53 (2): 510—522
Wang M W, Liu Y D, Chen X Y, et al. Response of soil nematode community to cultivation in upland red soil relative to cultivation history and its significance as indicator (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2016, 53 (2): 510—522
- [29] Ndayegamiye A, Côté D. Effect of long-term pig slurry and solid cattle manure application on soil chemical and biological properties. *Canadian Journal of Soil Science*, 1989, 69 (1): 39—47
- [30] 杨艳菊, 王改兰, 张海鹏, 等. 长期不同施肥处理对栗褐土可培养微生物数量的影响. *中国土壤与肥料*, 2013 (4): 35—38
Yang Y J, Wang G L, Zhang H P, et al. Effects of long-term different fertilization on culturable microorganisms quantity in cinnamon soil (In Chinese). *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2013 (4): 35—38
- [31] 夏昕, 石坤, 黄欠如, 等. 长期不同施肥条件下红壤性水稻土微生物群落结构的变化. *土壤学报*, 2015, 52 (3): 697—705
Xia X, Shi K, Huang Q R, et al. The changes of microbial community structure in red paddy soil under long-term fertilization (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2015, 52 (3): 697—705
- [32] Sun H Y, Deng S P, Raun W R. Bacterial community structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (10): 5868—5874
- [33] O' Donnell A G, Seasman M, Macrae A, et al. Plants and fertilizers as drivers of change in microbial community structure and function in soils. *Plant and Soil*, 2001, 232 (1/2): 135—145

- [34] Jiang Y J, Liang YT, Li C M, et al. Crop rotations alter bacterial and fungal diversity in paddy soils across East Asia. *Soil Biology & Biochemistry*, 2016, 95: 250—261
- [35] 刘文干, 何圆球, 张坤, 等. 一株红壤溶磷菌的分离、鉴定及溶磷特性. *微生物学报*, 2012, 52 (3) : 326—333
- Liu W G, He Y Q, Zhang K, et al. Isolation, identification and characterization of a strain of phosphate-solubilizing bacteria from red soil (In Chinese). *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52 (3) : 326—333
- [36] 梅新兰, 闪安琪, 蒋益, 等. 适应玉米的溶磷细菌筛选及其对玉米生长的影响. *土壤学报*, 2016, 53 (2) : 502—509
- Mei X L, Shan A Q, Jiang Y, et al. Screening of phosphate-solubilizing bacteria adaptable to corn and effects of the bacteria on the growth of corn (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2016, 53 (2) : 502—509

Study on Characteristics of Phosphorus-Dissolving Microbial Dissolving Phosphorus in Peanut Rhizosphere under Long-term Fertilization with Soil Suspension Cultivation Method

SUN Tingting^{1, 2} CHEN Yan^{1, 3†} FAN Jianbo^{1, 3} HE Yuanqiu^{1, 3} SUN Bo^{1, 3}

(1 Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

(2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(3 Red Soil Ecological Experiment Station, Chinese Academy of Sciences, Yingtan, Jiangxi 335211, China)

Abstract 【Objective】 The study was oriented to explore characteristics of phosphate-dissolving microbial (PDM) in peanut rhizosphere dissolving $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Ca-P), FePO_4 (Fe-P) and AlPO_4 (Al-P) as affected by fertilization in a 28-year long-term fertilization field experiment designed to have three fertilization treatments, i.e. NPK (pure chemical fertilizer-NPK), NPKM (combined fertilization of chemical fertilizer and pig manure) and NPKS (combined fertilization of chemical fertilizer and rice straw) in the red soil region. 【Method】 Soil samples were collected from the three treatments of the long-term field experiment for preparation of soil suspensions with NBRIP (National Botanical Research Institute Phosphate) (containing 10 g L^{-1} glucose, 2.5 g L^{-1} MgCl_2 , 0.25 g L^{-1} $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g L^{-1} KCl, 1 g L^{-1} $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15 g L^{-1} agar, pH 7.0, and 5 g L^{-1} $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ for the Ca-P test, 4.86 g L^{-1} FePO_4 for the Fe-P test, and 3.93 g L^{-1} AlPO_4 for the Al-P test), separately. Then the suspensions were incubated in lab and analyzed for variation of available phosphorus (AP) in and pH of the suspensions relative to treatment of the long-term fertilization experiment. In the experiment field of acidic soil, N, P and K was applied at a rate of 110 kg hm^{-2} , 29 kg hm^{-2} , 142 kg hm^{-2} in the form of urea, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ and KCl, respectively, and combined fertilization was done at a ratio of 7 : 3 on N input basis (chemical fertilizer and composted pig manure or straw). Each fertilization treatment had three replicates, 34.6 cm^2 in plot size. The plots were laid out randomly and separated with cement boards (20 cm above ground, 30 cm below ground). 【Result】 Results show that the treatments of combined fertilization stimulated propagation of PDM. In Treatments NPKM of the Ca-P and Fe-P types, PDM was 6.15 and 5.80 $\log(\text{cfu g}^{-1} \text{ dry soil})$ in density, respectively, higher than in all the other treatments. Among the treatments, Treatment NPKM was the highest in phosphorus solubilizing capacity and reached up to 221.8 mg kg^{-1} in Fe-P and 205.5 mg kg^{-1} in Al-P, or 134.6% ~ 144.6% and 10.48% ~ 153.2% higher than that in the other two treatments after 3 and 5 days of incubation, while Treatment NPKS was unique in ability to dissolve Ca-P, which was 21.33% and 24.57% higher than that in Treatment NPKM and NPK. Comparing to a single strain of bacteria, PDM did not show any

absolute advantages, but it did not reflect the real phosphate-dissolving effect under complicated field conditions and the effects of different fertilization treatments on phosphate-dissolving bacteria groups. 【Conclusion】 Therefore, it is found that long-term combined fertilization is more capable of stimulating propagation of PDM groups and hence dissolving more inorganic phosphorus in peanut rhizosphere soil. Consequently, soil P supply is improved and biomass/yield of peanut raised.

Key words Combination fertilization of inorganic fertilizer and organic manure; Soil suspension incubation method; Phosphate-dissolving microbial (PDM); Available phosphorus; pH

(责任编辑: 陈荣府)